

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
30 octobre 2003 (30.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/089000 A2(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61K 39/40[FR/FR]; 105, chemin du Crêt de Chaume, F-38330 Saint  
Ismier (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/01234

(74) Mandataire : AUDIER, Philippe; c/o BREVATOME, 3,  
rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 17 avril 2003 (17.04.2003)

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/04926

19 avril 2002 (19.04.2002)

FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COM-  
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];  
31/33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 Paris  
Cedex 16 (FR). SATTENTAU [FR/GB]; 19 East Street,  
OXFORD, OX2 0AU (GB).

## Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : VIVES, Ro-  
main [FR/FR]; Le Champ du port, F-38210 La Rivière  
(FR). VITA, Claudio [FR/FR]; 28 allée du bois de Gravelle,  
F-91190 Gif Sur Yvette (FR). LORTAT-JACOB, HuguesEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: ANTI-HIV COMPOSITION, PRODUCTION METHOD THEREOF AND MEDICAMENT

(54) Titre : COMPOSITION ANTI-VIH, PROCEDE DE FABRICATION ET MEDICAMENT.

(57) Abstract: The invention relates to an anti-HIV composition and to the production method thereof. The inventive composition comprises a polyanion and a molecule capable of inducing exposure of the CD4I epitope of the viral protein gp120. The polyanion can be selected, for example, from the group comprising heparin, heparan sulphate and a polyanion that is equivalent to heparin or heparan sulphate. The molecule capable of inducing exposure of the CD4I epitope of the viral protein gp120 is a CD4 peptide or a derivative of same. The invention also relates to the use of said composition for the production of a medicament, such as a medicament intended for the treatment of AIDS.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à une composition anti-VIH et à son procédé de fabrication. La composition de la présente invention comprend un polyanion et une molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120. Le polyanion peut être choisi par exemple dans le groupe constitué de l'héparine, de l'héparane sulfate, et d'un polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate. La molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 est un peptide CD4 ou un dérivé de celui-ci. La présente invention se rapporte également à l'utilisation de ladite composition pour la fabrication d'un médicament, notamment d'un médicament destiné au traitement du sida.

COMPOSITION ANTI-VIH, PROCEDE DE FABRICATION ET  
MEDICAMENT

DESCRIPTION

5

Domaine technique

La présente invention se rapporte à une composition anti-VIH et à son procédé de fabrication. Elle se rapporte également à l'utilisation de ladite  
10 composition pour la fabrication d'un médicament anti-VIH.

L'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans la cellule est une étape essentielle du cycle infectieux viral. Ce processus se divise en deux  
15 phases correspondant à l'interaction du virus à la surface cellulaire au niveau de récepteurs spécifiques de l'hôte, et à la pénétration du matériel génétique du virus dans la cellule cible.

Au cours des dix dernières années, les mécanismes  
20 d'adhésion du VIH à la surface cellulaire se sont considérablement clarifiés. Les partenaires moléculaires impliqués sont maintenant bien définis tel qu'exposé dans les documents [1, 2] de la liste de référence annexée.

25 Du côté du virus, les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 constituent la "clef de voûte" du complexe d'interaction virus/cellules. Dans un premier temps, gp120 s'associe avec une protéine transmembranaire de la cellule hôte, CD4. Cette  
30 interaction provoque un changement conformationnel de gp120 qui va exposer un épitope particulier, dit "CD4 induit" (CD4i). CD4i constitue un site de fixation pour

certaines membres de la famille des récepteurs des chimiokines (principalement CXCR4 et CCR5), qui vont jouer un rôle de co-récepteur de gp120 à la surface cellulaire. Cette deuxième interaction gp120/CCR5 ou gp120/CXCR4 provoque alors une réorganisation du complexe protéique gp120/gp41. Cette réorganisation expose gp41 ce qui permet alors l'initiation de la fusion des membranes cellulaires et virales, et l'entrée du matériel génétique viral dans la cellule.

10 Ces travaux permettent de définir deux nouvelles cibles thérapeutiques : l'inhibition de l'interaction de la gp120 avec CD4 et CCR5 ou CXCR4, et l'inhibition de la fusion [3].

#### 15 Art antérieur

Les références entre crochets [] renvoient à la liste de références annexée.

Dans le domaine de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) les trithérapies associant inhibiteurs nucléosidiques, non nucléosidiques et/ou antiprotéases ("HAART" pour "Highly Active Antiretroviral Treatment") ciblent la réplication et la maturation du virus.

Ces traitements permettent une réduction importante de la charge virale, mais ils ne permettent pas une éradication totale du virus dans l'organisme. En effet, l'arrêt de la prise de médicaments, même après plusieurs années de traitement, se traduit invariablement par une remontée rapide de la virémie plasmatique. Outre cet inconvénient, ces traitements présentent une toxicité importante et de nombreux effets secondaires.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements contre le SIDA, les processus d'adsorption du virus sur la cellule hôte constituent une cible thérapeutique particulièrement attractive, du fait  
5 notamment que cette étape se déroule à l'extérieur de la cellule.

Des peptides se liant à gp41 et inhibant son activité de fusion ont été développés [4, 5]. Les études cliniques en cours donnent des résultats  
10 positifs, indiquant que l'inhibition de la fusion, et donc de l'entrée du virus correspond effectivement à une cible thérapeutique intéressante.

Concernant l'attachement du virus, différentes études ont exploré l'utilisation de CD4 soluble pour  
15 inhiber l'interaction du virus avec le CD4 exprimé à la surface des cellules cibles du VIH. Cette solution s'est révélée inefficace, parce qu'en se fixant aux virus, le CD4 soluble expose l'épitope CD4i, et favorise en fait l'interaction du virus au co-récepteur  
20 CCR5 ou CXCR4, ce qui dans certains cas augmente l'infection [6].

En plus de CD4, les co-récepteurs sont aussi des sites d'attachement du virus sur les cellules. Les ligands naturels de ces co-récepteurs sont des  
25 chimiokines, notamment RANTES et MIP pour CCR5, et SDF pour CXCR4. In vitro ou sur des cellules en culture, ces chimiokines inhibent l'interaction du virus avec les cellules [7, 8], mais induisent aussi un certain nombre de réponses cellulaires les rendant difficile à  
30 utiliser d'un point de vue thérapeutique. Un certain nombre de composés tels que l'AMD301 ou des peptides se liant aux co-récepteurs ont aussi des effets anti-

viraux [9,10]. Cependant, en ciblant les co-récepteurs du VIH, ces différentes molécules bloquent également les fonctions intrinsèques de la cellule liée à l'utilisation de ces co-récepteurs.

5        Outre ces récepteurs cellulaires, le VIH est capable de se fixer à d'autres molécules présentes sur les cellules qu'il infecte, telles que DC-SIGN, les sphingolipides ou encore les héparanes sulfates [11].

10        Les héparanes sulfates sont des polysaccharides complexes appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs). Ils sont présents en abondance à la surface cellulaire et dans les matrices interstitielles, où ils sont trouvés ancrés sur le domaine extracellulaire de glycoprotéines  
15        particulières, les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG). Découverts il y a un demi-siècle à partir des préparations d'héparine (un autre type de GAG possédant des propriétés très voisines), les HS se distinguent de  
20        toute autre macromolécule biologique par la diversité de leur structure et des fonctions qu'ils exercent. Ils sont capables notamment de fixer la gp120 du VIH, et le virus utilise cette propriété pour s'adsorber à la surface des cellules cibles. Le site d'interaction des  
25        héparanes sulfates sur la gp120 est localisé sur une structure variable, appelée boucle V3 [12]. Néanmoins, le rôle exact de ces polysaccharides au cours de l'infection par le VIH reste peu clair. Des études ont montré que l'élimination des héparanes sulfates  
30        exprimés à la surface des cellules contribuait à rendre celles-ci moins permissives à l'infection par le virus [11] démontrant l'importance de cette molécule pour l'attachement et l'entrée du virus.

Sur la base de ces observations, différentes molécules polyanioniques de type héparine ont été développées pour inhiber l'interaction du virus avec les cellules. Cependant, les premiers essais cliniques  
5 n'ont montré que peu ou pas d'activité de ces molécules, et des effets toxiques ont pu être observés dans certains cas [13, 14].

Il apparaît donc nécessaire de mettre au point de  
10 nouveaux traitements contre le SIDA, moins contraignants, entraînant moins d'effets secondaires et permettant d'éviter les échappements, c'est à dire l'apparition de virus résistants, ne répondant plus aux traitements. Il est en outre nécessaire de trouver  
15 d'autres thérapies contre le VIH dirigées sur de nouvelles cibles.

C'est dans ce contexte que les inventeurs ont réalisé la présente invention.

## 20 Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour but de pallier les inconvénients précités en fournissant une nouvelle composition utilisable en tant qu'agent anti-VIH. Cette composition est capable de bloquer l'entrée  
25 du virus du SIDA dans ses cellules hôtes. A ce titre, elle est utilisable pour la préparation d'un médicament, en particulier d'un médicament destiné au traitement du sida.

La composition de la présente invention est  
30 caractérisée en ce qu'elle comprend un polyanion et une molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

Ainsi, conformément à la présente invention, les inventeurs ont réunis au sein d'une seule composition d'une part un polyanion, par exemple de type héparine ou héparane sulfate, et d'autre part une molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120, par exemple d'un peptide CD4 soluble. Ils ont montré que cette composition permet d'inhiber, de manière inattendue, à la fois l'interaction virus-héparanes sulfates de membranes cellulaires, en bloquant la boucle V3, et l'interaction virus-co-récepteurs, en bloquant le site CD4i. Les inventeurs ont en effet montré qu'il existe en fait deux domaines ou sites d'interaction des polyanions de type héparine ou héparane sulfate sur la gp120. Le premier est la boucle V3, le second est le domaine CD4i. Ils ont montré (voir exemples ci-dessous) que l'héparine, ou des fragments d'héparine de taille suffisante, en présence d'un peptide CD4, interagit avec le domaine CD4i de la protéine virale gp120 et que cette combinaison inhibe fortement l'interaction gp120/anticorps 48d ou 17b. 48d ou 17b sont utilisés comme mimes des corécepteurs.

Ce blocage du VIH avec la composition de la présente invention est d'autant plus inattendu que l'homme du métier sait que la molécule CD4 utilisée seule, peut avoir l'effet inverse de celui recherché car elle expose les domaines d'interaction avec les co-récepteurs, et peut donc augmenter l'infectivité par le virus.

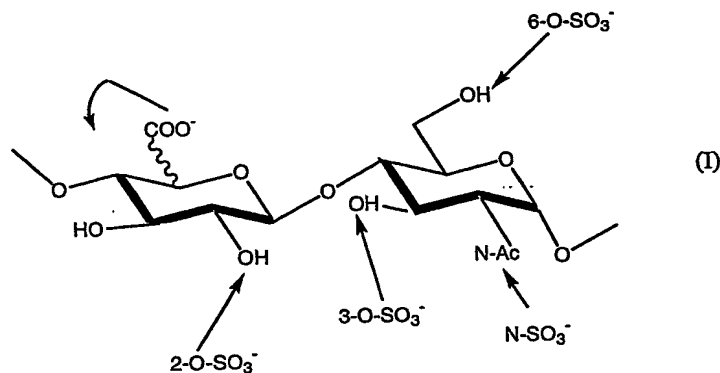
La composition de la présente invention vise donc une nouvelle cible thérapeutique au moyen d'héparine ou autres polyanions en présence du peptide CD4, à savoir

le blocage de l'interaction du VIH avec ses co-récepteurs. Cette solution est très intéressante du point de vue thérapeutique pour inhiber l'attachement du virus sur les cellules car elle cible le virus lui-même et non les cellules. Elle est donc au premier  
5    abond dépourvue des effets cellulaires qui sont observés avec les produits de l'art antérieur lorsque ce sont les co-récepteurs qui sont ciblés. En outre la toxicité de la composition de la présente invention  
10   pour un organisme est inférieure à la plupart des composés chimiques de l'art antérieur du fait de la nature de ses constituants.

Selon l'invention, le polyanion peut être choisi avantageusement dans le groupe constitué de l'héparine, de l'héparane sulfate, et d'un polyanion équivalent à  
15   l'héparine ou à l'héparane sulfate. Il s'agit par exemple du Dextran sulfate (marque de commerce, Ueno fine chem), du Curdlan sulfate (marque de commerce, Ajinomoto), du Naphtalene-2 sulfonate polymer (marque  
20   de commerce, Procept), du Pentosan polysulfate (marque de commerce, Baker norton pharm ; Hoechst), ou du Resobene (marque de commerce).

La structure du disaccharide constitutif (élément de base) de l'héparine et de l'héparane sulfate selon  
25   la présente invention est de formule (I) suivante :





Il est préférable que le polyanion ne soit pas trop long, car il aurait une activité anticoagulante, non souhaitée dans la présente invention, et formerait des liaisons aspécifiques avec différentes protéines, notamment la thrombine ou l'antithrombine III. Sa longueur sera de préférence similaire à une chaîne d'héparine ayant un degré de polymérisation tel que défini ci-dessous. Le polyanion présente de préférence au moins deux groupes anioniques par disaccharide. Selon la présente invention, lorsque le polyanion est de l'héparine ou de l'héparane sulfate, il aura de préférence un degré de polymérisation dp de 10 à 24, avantageusement de 12 à 24, de préférence de 16 à 22. Selon l'invention, l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou l'héparane sulfate peut avoir un degré de polymérisation dp de 12 à 20, par exemple de 15 à 17.

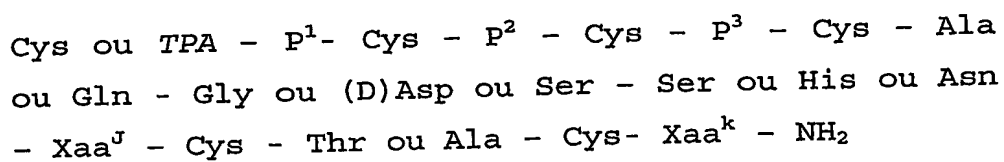
Selon l'invention, le polyanion peut être préparé par dépolymérisation partielle d'héparine ou d'héparane sulfate par une méthode enzymatique, par exemple au moyen d'héparinase, ou chimique, par exemple au moyen d'acide nitreux. Lorsqu'ils sont obtenus chimiquement, les héparanes peuvent être définis par la présence de glucosamine N-sulfatée ou N-acétylée, ou non substituée

en position N, liée à un acide uronique (acide glucuronique ou acide iduronique) avec une proportion variable de groupe sulfate. Des mêmes structuraux de ces oligosaccharides peuvent être obtenus par synthèse chimique.

Selon l'invention, la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 peut être choisie parmi un peptide CD4 ou un dérivé de ce peptide, ou encore un anticorps monoclonal se fixant sur la protéine virale gp120 et capable d'activer ladite protéine gp120 de façon équivalente au peptide CD4.

Lorsqu'il s'agit d'un peptide CD4, il est de préférence soluble pour les raisons évidentes de faciliter son interaction avec la protéine virale gp120 en milieu liquide, et de faciliter son accès à sa cible.

Selon l'invention, avantageusement, le peptide CD4 est de séquence (I) suivante :



dans laquelle TPA représente l'acide thiopropionique,  $\text{Xaa}^j$  représente la  $\beta$ -naphthylalanine, la phénylalanine ou la bi-phénylalanine,  $\text{Xaa}^k$  représente Gly, Val ou Ileu,  $\text{P}^1$  représente 3 à 6 acides aminés,  $\text{P}^2$  représente 2 à 4 acides aminés et  $\text{P}^3$  représente 6 à 10 acides aminés, les acides aminés dans  $\text{P}^1$ ,  $\text{P}^2$  et  $\text{P}^3$  étant naturels ou non naturels, identiques ou différents et  $\text{P}^1$ ,  $\text{P}^2$  et  $\text{P}^3$  ayant ou non une séquence

commune, ledit peptide présentant une conformation en épingle à cheveux  $\beta$  dont le coude  $\beta$  est formé par les résidus acides aminés Ala ou Gln - Gly ou DAsp ou Ser-Ser ou His ou Asn- Xaa<sup>1</sup> de sa séquence (A). En  
5 effet, ces peptides montrent une très grande affinité pour la protéine virale gp120.

Des exemples de tels peptides utilisables conformément à la présente invention sont les peptides de séquences IDn°1 à IDn°18 de la liste de séquences  
10 annexée ou des peptides équivalents.

Ces peptides peuvent être préparés par les techniques classiques de synthèse chimique en phase solide ou de recombinaison génétique.

Lorsque la molécule capable d'induire  
15 l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 est un anticorps, il peut être choisi par exemple parmi ceux décrits dans le document Sullivan N, Sun Y, Binley J, Lee J, Barbas CF<sup>3rd</sup>, Parren PW, Burton DR, Sodroski J, Determinants of human immunodeficiency  
20 virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies. *J Virol* 1998 ; 72(8) : pp.6332-6338.

Selon un premier mode de réalisation de la  
25 présente invention, le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans ladite composition. Cette composition conforme à la présente invention permet d'exposer le site d'interaction avec les co-  
30 récepteurs (site CD4i) et, de façon concomitante, de bloquer ce site par la partie oligosaccharidique constituée par le polyanion.

Suivant ce premier mode de réalisation, le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont avantageusement mélangés dans ladite composition en des proportions de 1 à 10 mole(s) de polyanion pour 0,5 à 1,5 mole de molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120. De préférence de 5 moles de polyanion pour 1 mole de molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

La présente invention se rapporte également à un procédé de fabrication de la composition suivant ce premier mode de réalisation de l'invention, comprenant les étapes suivantes :

- préparation du polyanion,
- préparation de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120,

le mélange du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir ladite composition.

Le mélange sera de préférence réalisé dans un tampon biologique pour pouvoir être utilisé pour fabriquer un médicament administrable. Le pH est de préférence d'environ 7, et la solution contient par exemple 15g/l de NaCl.

Selon un deuxième mode de réalisation de la présente invention, le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux dans ladite

composition. Ils forment un hybride polyanion/molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

5 Par exemple, selon l'invention, le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux au niveau d'une des extrémités du polyanion.

Lorsque le polyanion utilisé est de courte  
taille, par exemple avec un degré de polymérisation dp  
10 de 10 à 12, il peut être nécessaire de lier le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 au moyen d'un bras espaceur, ceci afin de permettre à l'hybride formé de se fixer sur l'ensemble de ses cibles sur la  
15 protéine virale gp120. Ce peut être le cas aussi, lorsque la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 est trop courte. Le bras espaceur peut être tout polymère, de préférence soluble dans les tampons aqueux, de longueur  
20 appropriée. On peut citer par exemple les polyosides ou polyglycols. Il peut s'agir par exemple du polyéthylèneglycol :  $(CH_2CH_2O)_n$ . Des préparations de bras espaceurs de ce type utilisables dans la présente invention ont été décrites largement dans l'art  
25 antérieur, par exemple dans les documents [18] et [19] (voir liste de références annexée).

La présente invention se rapporte également à un procédé de fabrication de la composition selon le deuxième mode de réalisation de l'invention, comprenant  
30 les étapes suivantes :

- préparation du polyanion,

- préparation de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120,

5       - liaison du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir ladite composition.

10       La liaison du polyanion avec la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i peut être formée par toutes les techniques connues de l'homme du métier, par exemple pour lier un polyanion et un peptide. Par exemple, les différentes méthodes décrites dans les documents [15], [16] et [17] (voir liste de  
références annexée) pour coupler un oligosaccharides à  
15       un polypeptide sont utilisables dans la présente invention.

20       Selon la présente invention, pour les raisons évoquées ci-dessus, il est aussi possible d'utiliser tout type d'agent pontant, ou bras espaceur, se fixant d'une part sur une extrémité de l'oligosaccharide et d'autre part sur une partie de CD4 non essentielle à sa fonction. Le bras espaceur peut être un de ceux précités. Sa préparation peut être réalisée de la manière décrite dans les documents [18]  
25       et [19].

30       La molécule hybride de la présente invention a un triple intérêt : elle se fixe à la protéine virale gp120 sur le site d'interaction de CD4, sur la boucle V3, lorsque ces gp120 sont issues de virus utilisant CXCR4 comme co-récepteur, et sur le domaine d'interaction avec les co-récepteurs (domaine CD4i), comme schématisé sur la figure 7 annexée. Elle permet

donc de bloquer simultanément tous les domaines que la gp120 utilise pour interagir avec ses récepteurs et co-récepteurs cellulaires.

5 D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront à l'homme du métier à la lumière des exemples ci-dessous, donnés à titre illustratif et non limitatif, en références aux figures et séquences annexées.

#### 10 Brève description de la liste de séquences

Les séquences IDn°1 à IDn°18 de la liste de séquences annexée sont des exemples non limitatifs de molécules capables d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 au sens de la présente invention. Ces molécules sont des peptides issus du CD4  
15 humain (SeqIDn°1), ou des peptides artificiels issus ou dérivés de peptides de venin de scorpion (SeqIDn°2 à 18).

#### 20 Brève description des figures

- La figure 1 est un graphique représentant la quantité de gp120/CD4, en unités de résonance (RU), fixée sur l'héparine en fonction du temps t (en secondes) pour différentes concentrations de CD4 (en  
25 nM) : courbes de bas en haut : 0 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 nM.

- La figure 2 est un graphique représentant la quantité de gp120/CD4, en unités de résonance (RU), fixée sur l'héparine en fonction de la concentration de  
30 CD4 (en nM).

- La figure 3 est un graphique représentant l'évolution de l'interaction protéine virale

gp120/anticorps 48d (réponse RU) en fonction du temps (en secondes) pour différentes concentrations en peptide CD4 (en nM) : courbes de bas en haut : 0 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 nM.

5 - La figure 4 est un graphique représentant l'inhibition de l'interaction du complexe gp120/CD4 avec l'anticorps 48d (réponse RU) en fonction du temps (en secondes) par différentes concentrations d'héparine H (en nM) : courbes de haut en bas : 0 ; 3 ; 6 ; 12 ;  
10 30 µg/ml.

- La figure 5 est un graphique représentant l'inhibition la quantité de complexes de gp120/CD4 fixés sur 48d en fonction de la taille du fragment d'héparine en degré de polymérisation, de dp 0 à dp 18  
15 (courbes du haut en bas : dp 0; dp 2; dp 4; dp 6; dp 8; dp 10; dp 12; dp 14; dp 16; dp 18).

- La figure 6 est un graphique représentant la quantité de complexes de gp120/CD4 fixés sur 48d en fonction de la taille du fragment d'héparine à partir  
20 des données représentées sur la figure 5.

- La figure 7 est un dessin montrant schématiquement la protéine virale gp120, et l'interaction d'une composition conforme au deuxième mode de réalisation de la présente invention avec la  
25 protéine virale gp120. Sur cette figure, sCD4bs (« s » pour soluble, et « bs » pour « binding site ») = site de liaison à CD4, V3 = boucle V3, CD4ni = site de liaison au co-récepteur non-induit (« ni ») (non accessible), CD4i = site de liaison au co-récepteur  
30 induit par la liaison de CD4 à gp120 (« i » pour induit), CD4/H = molécule hybride peptide CD4/héparine ou héparane sulfate selon le deuxième mode de



réalisation de la présente invention, et H = héparine ou héparane sulfate.

- Les figures 8 a) à h) sont des représentations graphiques de l'interaction de complexes de protéine virale gp120 et gp120/CD4 sur une biopuce de détection activée avec de l'héparine, à différentes concentrations de protéine virale gp120 : 0 nM (a) ; 0,62 nM (b) ; 1,25 nM (c) ; 2,5 nM (d) ; 5 nM (e) ; 10 nM (f), 20 nM (g) et 40 nM (h), avec une préincubation (lignes continues) ou sans préincubation (lignes discontinues) avec 80 nM de CD4 soluble.

- La figure 9 est une représentation graphique de l'inhibition de l'interaction gp120/CD4 par de l'héparine et des oligosaccharides d'héparine (H) sur une biopuce de détection activée par mAb17b. La protéine virale gp120 (5 nM) a été préincubée successivement avec un peptide CD4 (10 nM) et avec des concentrations d'héparine ([H]) à 0 nM (courbe a) ; 2,1 nM (b) ; 4,2 nM (c) ; 8,3 nM (d) ; et 16,7 nM (e), avant d'être injectée sur la surface mAb17b.

- La figure 10 est une représentation graphique de l'inhibition de l'interaction gp120/CD4 par de l'héparine et des oligosaccharides d'héparine (H) sur une biopuce de détection activée par mAb17b. La protéine virale gp120 (5 nM) a été préincubée successivement avec un peptide CD4 (10 nM) et avec une concentration d'héparine de 40 nM, avec différents degrés de polymérisation : dp 0 (courbe 1) ; dp 2 (courbe 2) ; dp 4 (courbe 3) ; dp 6 (courbe 4) ; dp 8 (courbe 5) ; dp 10 (courbe 6) ; dp 12 (courbe 7) ; dp 14 (courbe 8) ; dp 16 (courbe 9) ; dp 18 (courbe 10), avant d'être injectée sur la surface mAb17b.

- La figure 11 représente l'absorbance à 230 nm de différentes fractions (F) de 15 ml obtenues lors d'une synthèse enzymatique d'héparine à des degrés de polymérisation dp allant de 2 à 10 (le dp correspond aux chiffres indiqués sur la courbe).

- La figure 12 est un graphique réalisé à partir des résultats expérimentaux de l'exemple 10. Ce graphique montre les pourcentages d'interaction gp120/CXCR4 en présence ou non d'héparine.

#### EXEMPLES

Dans les exemples suivants, les analyses d'interaction gp120-héparine ont été effectuées par résonance plasmonique de surface (système BIAcore (marque de commerce)). Cette technique qui permet d'effectuer des mesures d'interaction en temps réel, présente également l'avantage de proposer un modèle proche de la réalité physiologique, où l'héparine immobilisée sur une biopuce de détection ("sensorchip") constitue une interface bidimensionnelle à l'image de la surface cellulaire.

#### Exemple 1 : SYNTHÈSE D'UN PEPTIDE CD4 UTILISABLE POUR FABRIQUER LA COMPOSITION DE LA PRÉSENTE INVENTION

Un peptide de la liste de séquences annexée est synthétisé par synthèse chimique en phase solide avec un synthétiseur automatique de peptides Applied Biosystems, mod. 433A, et en chimie Fmoc, qui utilise le groupement Fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc) pour la protection temporaire de la fonction  $\alpha$ -aminique des acides aminés. Les groupements protecteurs utilisés pour prévenir les réactions secondaires des chaînes

latérales des acides aminés, dans cette stratégie Fmoc, ont été le tertio-butyle éther (tBu) pour les résidus Ser, Thr et Tyr ; tertio-butyle ester (OtBu) pour Asp, Glu ; trityle (Trt) pour Gln, Asn, Cys, His ;  
5 tertio-butyloxycarbonyle (Boc) pour Lys et 2,2,5,7,8-pentamethylchromane-6-sulfonyl (Pmc) pour Arg.

La réaction de couplage se déroule avec un excès de 10 équivalents d'acides aminés (1 mmol) par rapport  
10 à la résine (0,1mmol). L'acide aminé protégé est dissous dans 1 ml de N-méthylpyrrolidone (NMP) et 1 ml d'une solution de 1-N-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) 1M dans le solvant NMP. 1 ml d'une solution de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 1M est alors  
15 ajouté. Après 40 à 50 minutes d'activation, l'ester actif formé est transféré dans le réacteur qui contient la résine. Avant cette étape de transfert puis de couplage, la résine est déprotégée de son groupement Fmoc par une solution de 20% de pipéridine dans le  
20 NMP. L'excès de pipéridine est enlevé par lavage à la NMP après 5 à 10 minutes environ.

Après synthèse du peptide, le peptide-résine est traité à 5 reprises avec une solution de 2% d'hydrazine dans la DMF. Le couplage d'un bras de liaison est  
25 réalisé pendant une heure à température ambiante dans la DMF avec 10 équivalents d'acide Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoïque utilisant le réactif HBTU en présence de diisopropyléthylamine. Le groupement Fmoc est ensuite déprotégé avec 20% de pipéridine dans la DMF.

30 Le peptide-résine est dès lors traité avec 10 équivalents de réactif de Traut (hydrochlorure de 2-

iminiothiolane (Sigma) en présence de DIEA. Le peptide est enfin libéré et déprotégé comme décrit ci-dessous.

Le clivage de la résine et des groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales ont été réalisées simultanément par traitement du peptide lié à la résine par de l'acide trifluoroacétique (TFA). Avant d'effectuer le clivage, la résine a été lavée plusieurs fois au dichlorométhane (DCM) et enfin séchée. Le réactif utilisé lors du clivage est un mélange acide contenant 81,5 % de TFA et les piègeurs phénol (5 %), thioanisole (5 %), eau (5 %), éthanedithiol (2,5 %) et tri-isopropylsilane (1 %). La résine a été traitée avec ce mélange pendant trois heures sous agitation et à température ambiante, à raison de 100 ml de solution par gramme de résine. Le peptide libre en solution a été récupéré par filtration. Le peptide a été ensuite précipité et lavé à froid dans l'éther de diisopropyle puis dissous dans de l'acide acétique à 20 % et lyophilisée.

Le peptide récupéré après lyophilisation, le brut de synthèse, se trouve sous forme réduite, c'est-à-dire que les ponts disulfure intrachâînes ne sont pas formés. La formation de ces liaisons covalentes a été réalisée en utilisant le couple redox cystamine/cystéamine. Le brut de synthèse a été repris dans l'eau ajoutée de TFA 0,1 % (v/v) et de chlorure de guanidinium 6M pour faciliter sa dissolution, à raison de 2,0 mg.ml<sup>-1</sup>. Cette solution a ensuite été ajoutée au goutte-à-goutte, diluée à 0,2 mg/ml<sup>-1</sup>, au tampon de réduction, composé de Tris/HCl 100mM, pH 7,8, et de cystéamine 5 mM. La cystamine (oxydant) 0,5 mM en final, a été ajoutée après 45 minutes de réaction à

température ambiante. Le milieu est amené à pH 3,0 après 30 minutes.

La cystéamine permet de réduire les groupements thiols présents sur le peptide. A l'air libre, elle s'oxyde et permet l'oxydation de cystéines et donc le repliement du peptide par formation de ponts disulfure intrachâînes. La cystamine ajoutée en fin de manipulation permet de parfaire le repliement. Le bon déroulement de l'oxydation est vérifié par chromatographie analytique en comparant les temps de rétention des produits brut et oxydé, plus importants pour le premier.

Les peptides ont été purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur une colonne préparative Vydac C18 (1,0 x 25,0 cm). On a utilisé un gradient linéaire 0-60 % d'acétonitrile dans une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique à 0,1 % pendant 90 minutes. Les fractions du pic majeur ont été analysées par HPLC analytique; les fractions ne présentant qu'un seul pic ont été rassemblées et lyophilisées.

Les produits ainsi obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse. Il s'agit des peptides de la liste de séquence annexée.

EXEMPLE 2 : SYNTHÈSE D'UN POLYANION DE TYPE HÉPARINE OU HÉPARANE SULFATE UTILISABLE POUR LA COMPOSITION DE LA PRÉSENTE INVENTION

A) Synthèse enzymatique

5

Une molécule d'héparine ou d'héparane sulfate ayant un degré de polymérisation  $dp$  défini est synthétisée.

10 6 g d'héparine sont solubilisées dans un tampon contenant 5 mM de tris, 2 mM de  $CaCl_2$ , 50 mM de NaCl et 0,1 mg/ml d'albumine. Le pH est ajusté à 7,5 avec de l'acide acétique. Cette solution est incubée à 25°C, avec de l'héparinase I (8 mU/ml) pendant environ 50 h (la réaction enzymatique est suivi par l'augmentation  
15 de la densité optique, mesurée à 232 nm).

Le mélange est ensuite purifié par chromatographie de filtration sur gel. La phase solide est du Biogel P10, contenue dans une colonne de 1,50 m et 4,4 cm de diamètre, éluée à 1 ml/min avec du NaCl  
20 0,25 M.

La figure 11 représente l'absorbance à 230 nm des différentes fractions de 15 ml obtenues pour des degrés de polymérisation  $dp$  allant de 2 à 10.

25 Les différents oligosaccharides ( $dp_2$ ,  $dp_4$ , ..., etc.) sont dialysés contre de l'eau puis lyophilisés.

B) Synthèse par dépolymérisation chimique à partir de produit naturel

30 Lorsque le matériel de départ est de l'héparine, on procède de la façon suivante : 1 g d'héparine est solubilisé dans 20 ml de sodium nitrite ( $NaNO_2$ ) à 2,1 mg/ml. La solution est ajustée à pH 1,5 avec de

l'acide sulfurique, puis incubée à 4°C pendant 3h. La réaction est arrêtée, et les oligosaccharides sont purifiés comme ci-dessus dans le paragraphe A).

Lorsque le matériel de départ est de l'héparane sulfate, on procède de la façon suivante : 8 g d'héparane sulfate sont solubilisés dans 40 ml contenant 5 mM de tris, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM de NaCl et 0,1 mg/ml d'albumine. Le pH est ajusté à 7,5 avec de l'acide acétique. Cette solution est incubée à 30°C, avec de l'héparinase III (25 mU/ml) pendant environ 72h. De héparinase III est ajoutée à nouveau, pour une période de 48h, puis les produits sont purifiés comme décrit ci-dessus dans le paragraphe A).

15 EXEMPLE 3 : SYNTHESE D'UNE COMPOSITION DE LA PRESENTE INVENTION : MELANGE D'UN PEPTIDE CD4 AVEC UN POLYANION

Dans cet exemple, un peptide CD4 de l'exemple 1 est mélangé avec un héparane sulfate préparé dans l'exemple 2.

20 Ces deux molécules sont mises en solution à une concentration deux fois supérieure à la concentration finale désirée. Ces mises en solutions sont effectuées dans un tampon physiologique. Par exemple PBS, TBS (Tris 50mM, NaCl 0,15M, pH 7,5), ou HBS (Hepes 20mM, NaCl 0,15M, pH 7,5).

25 Les deux préparations sont ensuite mélangées volume à volume (1/1).

EXEMPLE 4 : SYNTHÈSE D'UNE COMPOSITION DE LA PRÉSENTE  
INVENTION : COUPLAGE D'UN PEPTIDE CD4 AVEC UN POLYANION

Dans cet exemple, un peptide CD4 de l'exemple 1  
est couplé avec l'héparane sulfate préparé dans  
5 l'exemple 2.

L'héparane sulfate est incubé avec un excès  
molaire d'hydrazine ou de carbodihydrazide. Cette étape  
a pour fonction de placer un groupe hydrazine sur  
l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide, lorsque  
10 celui-ci est préparé par dépolymérisation enzymatique,  
ou sur l'aldéhyde de l'oligosaccharide, lorsque celui-  
ci est préparé par dépolymérisation chimique à l'acide  
nitreux.

Les carbohydrates du peptide CD4 soluble sont  
15 oxydés par traitement au périodate de sodium, la  
fonction aldéhyde ainsi créée est utilisée pour le  
couplage de l'oligosaccharide hydraziné.

L'oligosaccharide, généralement en solution à  
1 mM dans un tampon PBS (phosphate de sodium salin) est  
20 co-incubé avec un excès molaire (par exemple jusqu'à  
100 fois) d'hydrazine ou de carbodihydrazide également  
en solution dans PBS. Le mélange réactionnel est incubé  
à température ambiante, puis purifié par dessalage ou  
dialyse contre de l'eau distillée, et finalement séché  
25 par évaporation sous vide ou lyophilisé.

La molécule de CD4 soluble (sCD4) glycosilée  
(produite dans des cellules de mammifères ou des  
cellules d'insectes) est reprise dans un tampon  
phosphate 20 mM, pH 6,2 puis traitée par du périodate  
30 de sodium (10 mM) pendant 20 minutes, à 4°C et à  
l'obscurité. Pour éliminer le périodate de sodium, le



mélange réactionnel est dessalé par gel filtration ou par dialyse contre le tampon phosphate.

Le sCD4, dont les glycanes sont ainsi oxydés, est co-incubé avec un excès molaire d'oligosaccharide hydraziné à 4°C, pour former le complexe entre les deux molécules.

Lorsque le CD4 n'est pas glycosilé, on procède de la manière décrite par Najjam et al. dans le document [17].

Il est aussi possible d'utiliser tout type d'agent pontant se fixant d'une part sur une extrémité de l'oligosaccharide et d'autre part sur une partie du peptide CD4 non essentielle à sa fonction. L'homme du métier n'aura pas de difficultés à mettre en œuvre ce procédé ou un procédé équivalent.

EXEMPLE 5 : MISE EN EVIDENCE DE L'AUGMENTATION DE L'AFFINITE DE gp120 POUR L'HEPARINE PAR CD4

30 unités de résonance (RU) d'héparine biotinylée sont immobilisées à la surface d'une biopuce ("sensorchip" B1 fabriquée par la société Biacore).

gp120 (hxbc2) à 50 nM est incubée pendant 1 heure 30 min avec des concentrations croissantes de CD4 soluble à 0, 50, 100, 250 ou 500 nM ; puis injectée sur la surface d'héparine à 10 µl/min.

Les analyses d'interaction gp120-héparine par résonance plasmonique de surface ont été effectuées en fonction du temps.

Les courbes de la figure 1 correspondent à l'injection de gp120 à 50 nM et de CD4 respectivement à 0, 50, 100, 250 ou 500 nM (respectivement pour les courbes de bas en haut sur cette figure).

La figure 2 montre la quantité de gp120/CD4 fixée sur l'héparine en fonction de la concentration de CD4.

Il apparaît qu'un rapport molaire de CD4 : gp120 d'environ 5:1 produit la réponse maximum.

5        Ces résultats montrent que l'exposition du domaine CD4i de la gp120 augmente fortement l'interaction de gp120 avec l'héparine. CD4i représente donc un nouveau site d'interaction avec l'héparine.

10    EXEMPLE 6 : INTERACTION gp120/48D DEPENDENTE DE CD4

1250 RU d'anticorps 48d spécifique de l'épitope CD4i sont immobilisées à la surface d'une biopuce ("sensorchip" B1) comme dans l'exemple 1 ci-dessus.

15        La protéine virale gp120 (hxbc2) à 50 nM est incubée pendant 1h20 avec des concentrations croissantes de CD4 soluble à 0, 50, 100, 250 ou 500 nM ; puis injectée sur la surface 48d à 10 µl/min.

20        Les analyses d'interaction gp120-héparine par résonance plasmonique de surface ont été effectuées en fonction du temps.

Les courbes de la figure 3 correspondent à l'injection de gp120 à 50 nM et de CD4 respectivement à 0, 50, 100, 250 ou 500 nM (respectivement pour les courbes de bas en haut sur cette figure).

25        Cet exemple montre que l'interaction gp120/48d dépend de CD4, et que 48d interagit avec CD4i, le domaine de reconnaissance des co-récepteurs. Cet anticorps peut donc être utilisé comme modèle de l'interaction de gp120 avec un co-récepteur.

EXEMPLE 7 : INHIBITION DE L'INTERACTION PROTEINE gp120  
- 48d PAR L'HEPARINE

La protéine gp120 est co-incubée pendant 40 minutes avec CD4. Le mélange est ensuite divisé en 5 aliquots dans lesquels est ajoutée l'héparine (15 kDa) à différentes concentrations.

Les concentrations finales dans les aliquotes sont : gp120 : 50 nM ; CD4 : 250 nM et héparine : 0, 3, 6, 12 ou 30 µg/ml respectivement du haut en bas sur la figure 4. Sur la courbe du haut, pas d'héparine, on visualise l'interaction gp120/CD4, toutes les autres courbes sont en présence d'héparine (de 3 à 30µg/ml respectivement du haut en bas, figure 4).

Après 40 minutes d'incubation, les différents mélanges sont injectés sur la surface 48d.

Les analyses d'interaction gp120-héparine par résonance plasmonique de surface ont été effectuées en fonction du temps.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 4. Ils montrent que l'héparine inhibe l'adsorption du complexe gp120/CD4 sur la surface d'anticorps 48d. L'héparine s'avère d'ailleurs être un inhibiteur efficace puisque l'inhibition est pratiquement complète dès la plus faible des concentrations testées (3 µg/ml).

Ceci montre que l'héparine entre en compétition avec 48d et se fixe donc sur CD4i.

Cet exemple indique que l'activité inhibitrice des oligosaccharides (héparine), tels que définis ci-dessus, est obtenue en présence de CD4.

Ce résultat permet de proposer l'utilisation d'une molécule hybride composée de CD4 et

d'oligosaccharides de type héparine, liés de façon covalente, ou d'un mélange de ces deux molécules.

L'interaction directe du domaine CD4i avec un polyanion n'a jamais été décrite dans l'art antérieur, de même que l'inhibition de l'interaction gp120-anticorps 48d par un polyanion. Il n'existait pas de travaux montrant l'inhibition possible de gp120 avec les co-récepteurs par une molécule de type héparine.

10 Exemple 8 : INHIBITION DE L'INTERACTION gp120-48d PAR DES FRAGMENTS OLIGOSACCHARIDES DE TAILLES DEFINIES

Les fragments oligosaccharides de tailles définies sont obtenus par dépolymérisation enzymatique.

La protéine virale gp120 est co-incubée pendant 15 60 minutes avec CD4 de façon à exposer le domaine CD4i. Le mélange est réparti en 8 aliquots et des fragments d'héparine de taille croissante, comprenant de 1 à 8 motifs disaccharides de base, soit un degré de polymérisation (dp) de 2 à 16, sont ajoutés pour donner 20 des concentrations finales de 50 nM pour gp120, 250 nM pour CD4 et 125 nM pour les fragments d'héparine (la masse moléculaire d'un disaccharide est d'environ 600 Da.

Les mélanges sont ensuite injectés sur la surface 25 48d (figure 5). Les données obtenues permettent de représenter la quantité de complexes de gp120/CD4 fixés sur 48d en fonction de la taille du fragment d'héparine (figure 6).

Ces résultats montrent que des oligosaccharides 30 de taille égale ou inférieure à dp6 (3 disaccharides) n'ont pas la capacité de bloquer l'interaction du complexe gp120/CD4 avec 48d.

En revanche, l'interaction est complètement inhibée par les fragments dont la taille est supérieure à dp 10 et mieux encore à dp12, à la concentration testée.

5 Ces résultats révèlent par exemple qu'une concentration de 125 nM d'héparine ayant un degré de polymérisation égal à 16 (dp16), soit 0,6µg/ml, en présence de CD4 à 250 nM, inhibe 90 à 100% de l'interaction de l'anticorps 48d à la gp120 (50 nM), ce  
10 qui confirme l'existence d'une interaction directe. De même, des oligosaccharides d'héparine de type dp14 à dp18 à 40 nM, inhibent l'interaction du complexe gp120 (5 nM)/CD4 (10 nM) avec l'anticorps 17b.

Ces résultats montrent que l'héparine, une  
15 molécule de structure très voisine des héparanes sulfates, interagit également avec un deuxième site de fixation sur la gp120. Ce site nommé CD4i, est un épitope uniquement exposé lorsque gp120 interagit avec CD4, qui constitue le site de fixation des co-  
20 récepteurs du VIH. Ces résultats montrent que la présence de CD4 qui a pour effet d'exposer le site CD4i augmente de façon très considérable l'interaction gp120-héparine ou gp120-héparane sulfate : ceci n'a  
25 jamais été décrit par ailleurs et constitue la première preuve d'une interaction possible entre gp120 et héparine ou héparane sulfate par l'intermédiaire du site CD4i.

Une étude en modélisation moléculaire a montré que le site CD4i de la gp120 est constitué d'acides  
30 aminés basiques. Ces résidus basiques sont alignés sur la surface de la protéine, et constituent effectivement un site d'interaction avec l'héparine, ou des

oligosaccharides dérivés d'héparine ou d'héparane sulfate.

Les inventeurs proposent donc par la présente une utilisation thérapeutique des composés poly-anioniques ciblant ce nouveau site d'interaction. L'approche consiste en l'utilisation conjuguée de polyanions et de molécules capables d'exposer l'épitope CD4i, en co-administration ou sous la forme d'une molécule hybride. Ce type de molécule bloque simultanément tous les domaines d'interaction de la gp120 avec les cellules hôtes.

Exemple 9 : Protocole pour l'activation d'oligosaccharides en vue de leur couplage avec une protéine

Le protocole repose sur la réaction d'un groupe aldéhyde (sur l'oligosaccharide) avec un groupe amine ou hydrazide sur la protéine.

Lorsque les oligosaccharides sont obtenus par dépolymérisation chimique de l'héparine (par l'acide nitreux), la fonction aldéhyde est créée au site de coupure, et l'oligosaccharide est prêt pour le couplage.

Lorsque les oligosaccharides sont obtenus par dépolymérisation enzymatique, on peut procéder de la façon suivante :

Les oligosaccharides, à une concentration d'environ 10 mM sont incubés dans une solution saturante de bicarbonate d'ammonium, pendant 96 heures. Le mélange réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel filtration, équilibrée avec du bicarbonate d'ammonium à 10 mM, puis l'échantillon est

lyophilisé à plusieurs reprises afin d'éliminer le bicarbonate d'ammonium résiduel. Cette étape a pour but de créer une glycosylamine à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide.

5 De façon alternative, on peut aussi incubier l'oligosaccharide (10 mM) avec 0,25 M d'adipate dihydrazide, en présence de cyanoborohydrate de sodium ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , 1 M) à pH 5, pendant 96 heures. Le mélange réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel  
10 filtration, équilibrée dans l'eau distillée, puis séché par lyophilisation. Cette étape a pour but d'introduire une fonction hydrazide à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide.

Les oligosaccharides, préparés selon les deux  
15 méthodes ci-dessus sont ensuite incubés avec 0,5 M de diglutaraldéhyde, à pH 5 pendant 4 heures, puis avec 0,1 M de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  pendant 30 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel  
filtration, équilibrée dans l'eau distillée, puis séché  
20 par lyophilisation. Cette étape a pour but de placer une fonction aldéhyde à l'extrémité réductrice des oligosaccharides.

Exemple 10 : Démonstration de l'activité inhibitrice  
25 des oligosaccharides sur l'interaction de la gp120 avec  
le co-récepteur (CXCR4) du virus

Des cellules CHO (mutant 2241, déficient dans l'expression des glycosaminoglycanes, il ne fabrique pas d'héparane sulfate) transfectées avec le gène de  
30 CXCR4 sont pré-incubées avec : de la gp120 (20µg/ml), avec ou sans héparine, ou des complexes gp120/CD4 (20µg/ml pour chacune des protéines), ou des complexes

gp120/CD4 préalablement incubées avec de l'héparine de 6 kDa (10µg/ml) ou un dodécasaccharide d'héparine (10µg/ml).

La gp120 fixée à la surface des cellules est  
5 détectée en utilisant un anticorps anti-gp120 couplé à un anticorps secondaire marqué au FITC, puis analysée en FACS.

Les résultats représentés sur la figure 12  
annexée montrent les pourcentages d'interaction  
10 gp120/CXCR4. Le contrôle négatif (0%) correspond à la fixation non spécifique de gp120 sur les cellules (gp120 seule ou en présence d'héparine (1). Le contrôle positif (100%) est observé pour les complexes  
15 gp120/CD4 (2), et correspond à la liaison de gp120 au corécepteur CXCR4, induit par CD4. L'héparine (3) et le dodécasaccharide (4) réduisent tous deux l'interaction de manière importante (8,5 et 4,1%, respectivement, soit 91,5 et 95,9 % d'inhibition).

L'héparine utilisée inhibe bien l'interaction de  
20 - gp120 avec le corécepteur.



## Références bibliographiques

[1] Chan D.C., Kim P.S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* 93 : 681-684.

5

[2] Claphan P.R. 1997 HIV and chemokines : ligands cell surface receptors. *Trends in cell biol.* 7 : 264-268.

10 [3] Michael N.L., Moore J.P. (1999), HIV entry inhibitors : evading the tissue, *Nat Med* 5 : 740-2.

[4] Chan D.C. Chutkowski C.T. Kim PS. (1998), Evidence that a prominent cavity in the coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 15613-7.

15

[5] Doms R.W., Moore J.P. (2000), HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J. Cell Biol* 151 : F9-14.

20

[6] Schenten D. Marcon L, Karlsson GB, Parolin C, Kodama T, Gerard N, Sodroski J. (1999), Effect of soluble CD4 on simian immunodeficiency virus infection of Cd4-positive and CD4-negative cells, *J Virol.* 73 : 5373-80.

25

[7] Chen J.D., Bai X., Yang A.G. Cong Y., Chen S.Y. (1997), Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy. *Nat Med* 3 : 1110-6.

30

- [8] Oberlin E., Amara A. Bachelierie F. Bessia C., Virelizier JL, Arenza-Seisdedos F., Schwartz O., Heard J.M., Clark-Lewis I., Legler D.F., Loetscher M. Baggiolini M., Moser B., (1996), The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusion and prevent infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382 : 833-5.
- [9] Proudfoot A.E., Wells T.N., Clapham P.R., (1999) Chemokine receptors-future therapeutic targets for HIV ? *Biochem Pharmacol.* 57:451-63.
- [10] Muramaki T., Nakajima T., Koyanagi Y., Tachibana K., Fujii N., Tamamura H., Yoshida N., Waki M., Matsumoto A., Yoshie O., Kishimoto T., Yamamoto N., Nagasawa T., (1997), A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* 186:1389-93.
- [11] Mondor I., Ugolini S., Sattentau Q.J., (1998) : "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Attachment to HeLa CD4 Cells Is Independent and gp120 Dependent and Requires Cell Surface Heparans", *J. Virol.* 72 : 3623-34.
- [12] Roderiquez G., Oravec T., Yanagishita M., Bou-Habib D.C., Mostowski H., Norcross M.A., (1995) : "Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interactions of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41", *J. Virol.* 69 : 2233-9.

- [13] Abrams D.I., Kuno S., Wong R., Jeffords K., Nash M., Molaghan J.B., Gorter R., Uenor R., (1989) : "Oral dextran sulfate (UA001) in the treatment of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex", *Ann. Intern. Med.* 110 : 183-8.
- [14] Flexner C., Barditch-Crovo P.A., Kornhauser D.M., Farzadegan H., Nerhood L.J., Chaisson R.E., Bell K.M., Lorentsen K.J., Hendrix C.W., Petty B.G., Lietman P.S., (1991) : Pharmacokinetics, toxicity, and activity of intravenous dextran sulfate in human immunodeficiency virus infection", *Antimicrob. Agents Chemother.* 335 : 2544-50.
- [15] Chernyak A, Karavanov A, Ogawa Y, Kovac P, Conjugating oligosaccharides to proteins by squaric acid diester chemistry : rapid monitoring of the progress of conjugation, and recovery of the unused ligand, *Carbohydr. Res.* 2001, 330(4):479-486.
- [16] Kuberan B, Gunay NS, Dordick JS, Linhardt RJ, Preparation and isolation of neoglycoconjugates using biotin-streptavidin complexes, *Glycoconj. J* 1999, 16(6):271-281.
- [17] Najjam S, Gibbs RV, Gordon MY, Rider CC, Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach, *Cytokine* 1997, 9(12):1013-1022).

[18] Dreef-Tromp CM, Basten JE, Broekhoven MA, Van  
Dinther TG, Petitou M, Van Boeckel CA, Biological  
properties of synthetic glycoconjugate mimics of  
heparin comprising different molecular spacers, *Bioorg.*  
5 *Med. Chem. Lett.* 1998, 8-16 : 2081-2086.

[19] Grootenhuis PD, Westerduin P, Meuleman D, Petitou  
M, Van Boeckel CA, Rational design of synthetic heparin  
analogues with tailor-made coagulation factor inhibitor  
10 activity, *Nat. Struct. Biol.* 1995, 2(9) : 736-739.

## REVENDICATIONS

1. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un polyanion et une molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 choisie parmi un peptide CD4 ou un dérivé de ce peptide, ou encore un anticorps monoclonal se fixant sur la protéine virale gp120 et capable d'activer ladite protéine gp120 de façon équivalente au peptide CD4.
2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le polyanion est choisi dans le groupe constitué de l'héparine, de l'héparane sulfate, et d'un polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate.
3. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 10 à 24.
4. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 12 à 20.
5. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 15 à 17.

6. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le peptide CD4 est de séquence (I) suivante :

5 Cys ou TPA - P<sup>1</sup>- Cys - P<sup>2</sup> - Cys - P<sup>3</sup> - Cys - Ala ou  
Gln - Gly ou (D)Asp ou Ser - Ser ou His ou Asn -  
Xaa<sup>J</sup> - Cys - Thr ou Ala - Cys- Xaa<sup>K</sup> - NH<sub>2</sub>

10 dans laquelle TPA représente l'acide  
thiopropionique, Xaa<sup>J</sup> représente la  $\beta$ -naphthylalanine,  
la phénylalanine ou la bi-phénylalanine, Xaa<sup>K</sup>  
représente Gly, Val ou Ileu, P<sup>1</sup> représente 3 à 6 acides  
aminés, P<sup>2</sup> représente 2 à 4 acides aminés et P<sup>3</sup>  
représente 6 à 10 acides aminés, les acides aminés dans  
15 ou différents et P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> ayant ou non une séquence  
commune, ledit peptide présentant une conformation en  
épingle à cheveux  $\beta$  dont le coude  $\beta$  est formé par les  
résidus acides aminés Ala ou Gln - Gly ou DAsp ou  
Ser-Ser ou His ou Asn- Xaa<sup>J</sup> de sa séquence (A).

20

7. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le peptide CD4 est choisi parmi les séquences IDn°1 à IDn°18 de la liste de séquences annexée.

25 8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans ladite composition.

9. Composition selon la revendication 8, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans ladite composition en des proportions de 1 à 10 mole(s) de polyanion pour 0,5 à 1,5 mole de molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

10. Composition selon la revendication 7, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans ladite composition en des proportions de 5 moles de polyanion pour 1 mole de molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux dans ladite composition.

12. Composition selon la revendication 11, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux au niveau d'une des extrémités du polyanion.

13. Composition selon la revendication 11, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale

gp120 sont liés entre eux au moyen d'un bras espaceur de type polyéthylène glycol.

14. Procédé de fabrication d'une composition  
5 selon la revendication 8, comprenant les étapes suivantes :

- préparation du polyanion,
- préparation de la molécule capable  
d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine  
10 virale gp120,

- mélange du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir ladite composition.

15

15. Procédé de fabrication d'une composition  
selon la revendication 11, comprenant les étapes  
suivantes :

- préparation du polyanion,
- 20 - préparation de la molécule capable  
d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120,

- liaison du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la  
25 protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir ladite composition.

16. Procédé de fabrication selon la revendication  
14 ou 15, dans lequel le polyanion est préparé par  
30 dépolymérisation partielle d'héparine ou d'héparane sulfate par une méthode enzymatique ou chimique.



17. Procédé de fabrication selon la revendication  
14 ou 15, dans lequel la molécule capable d'induire  
l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale  
gp120 étant un peptide, celui-ci est préparé par  
5 synthèse chimique en phase solide ou par recombinaison  
génétique.

18. Utilisation d'une composition selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation  
10 d'un médicament.

19. Utilisation d'une composition selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation  
d'un médicament destiné au traitement du sida.

15

20

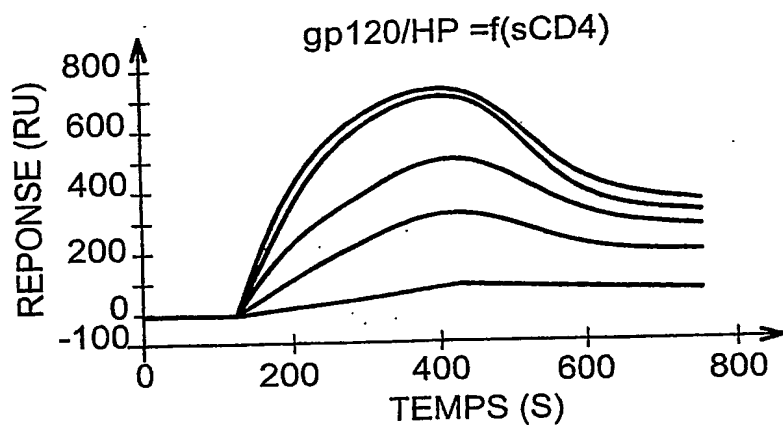


FIG. 1

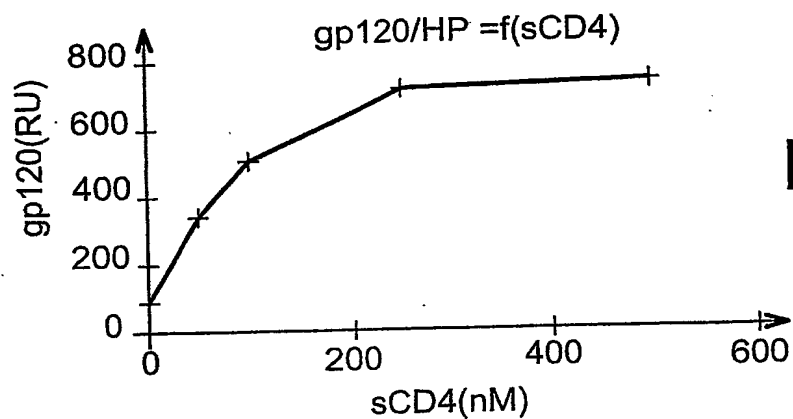


FIG. 2

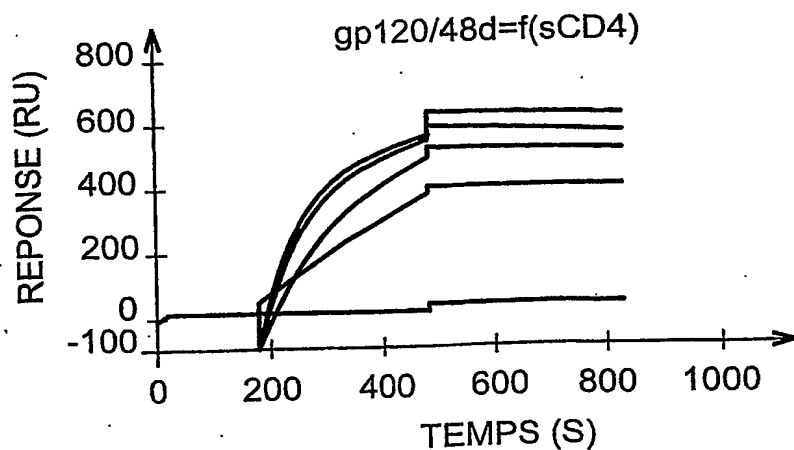


FIG. 3

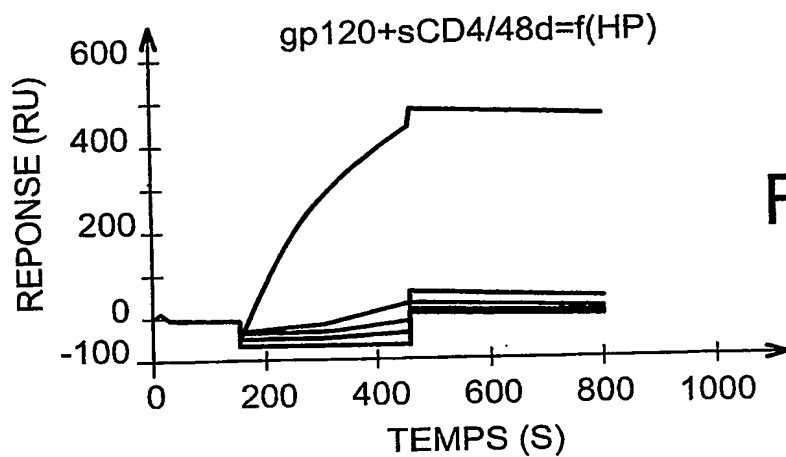


FIG. 4

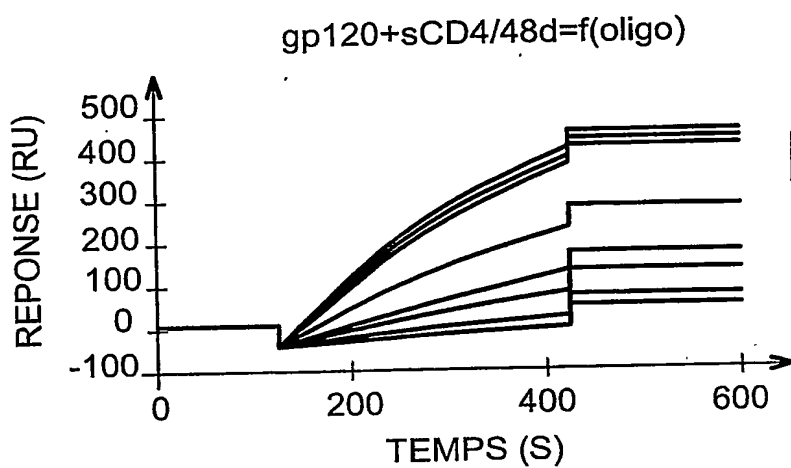


FIG. 5

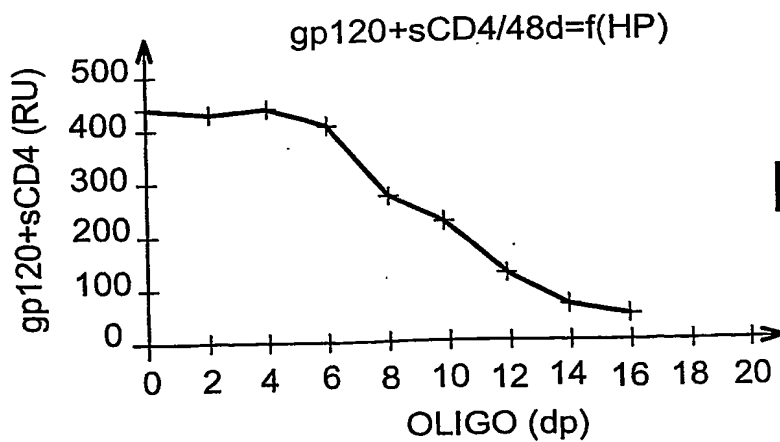


FIG. 6

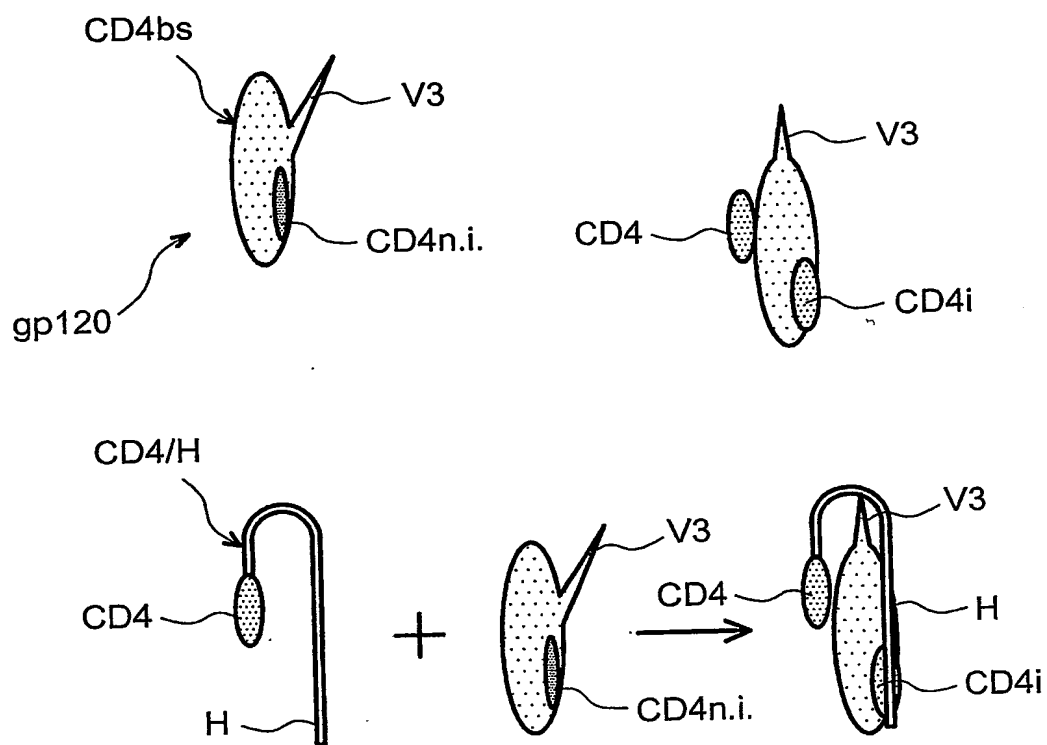


FIG. 7

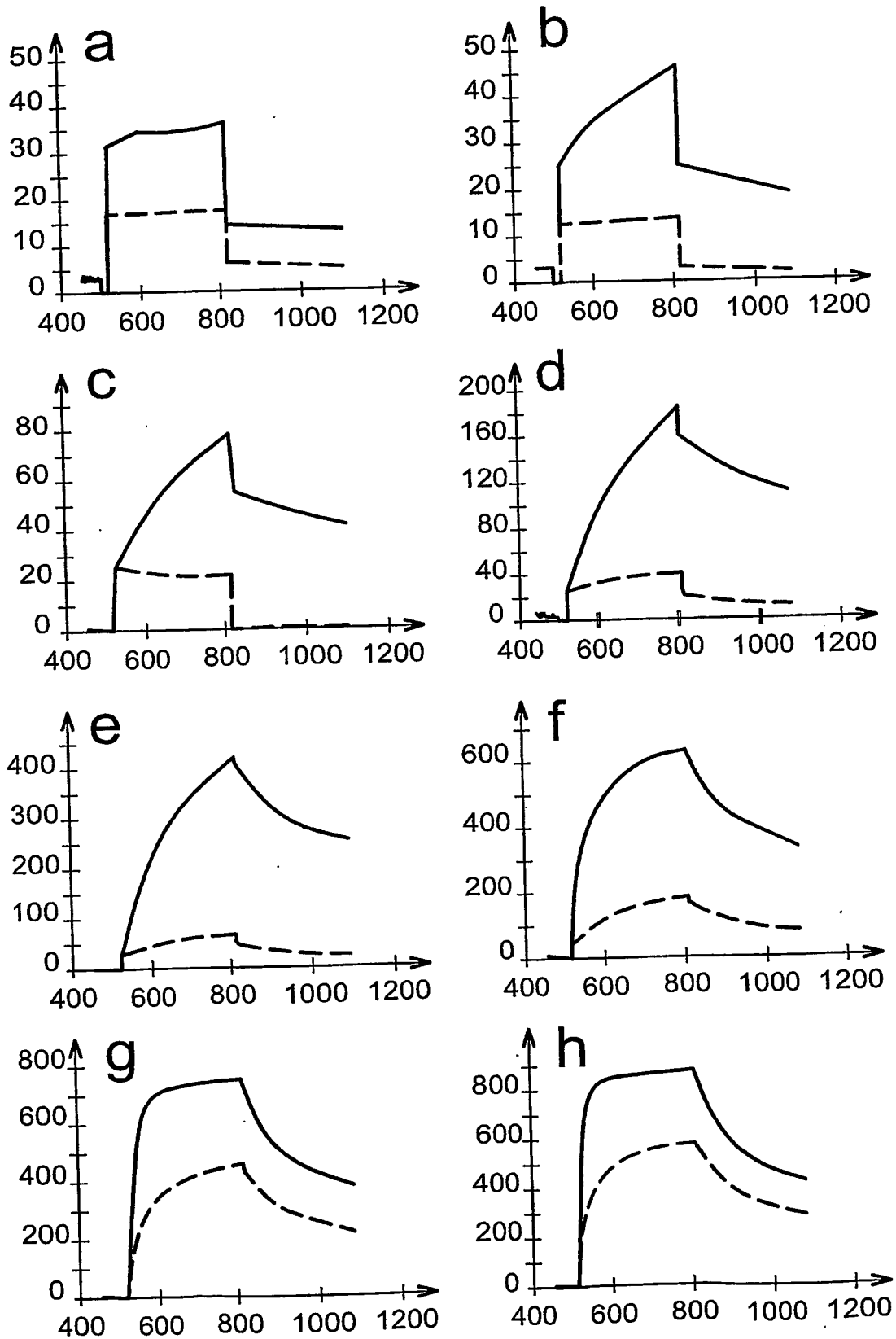


FIG. 8

5 / 6

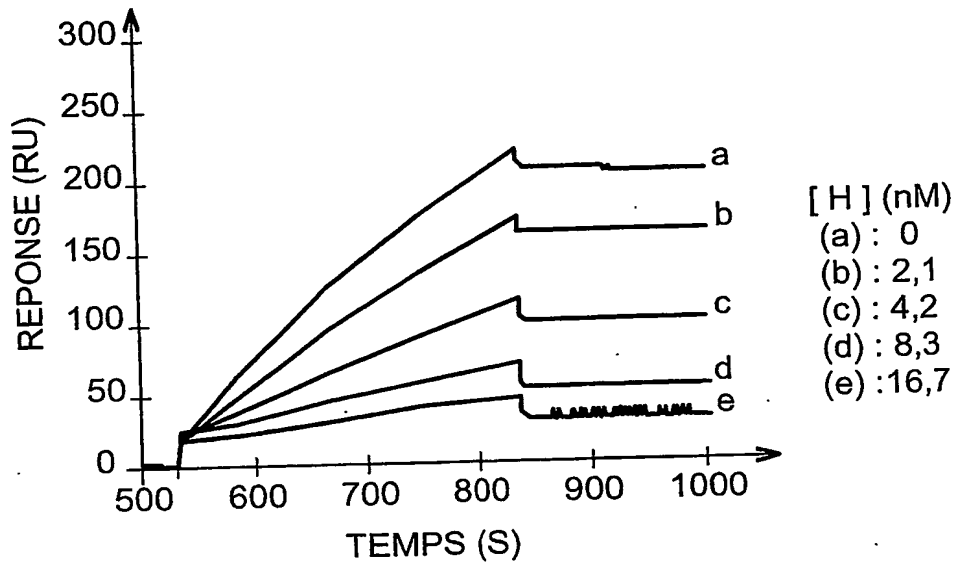


FIG. 9

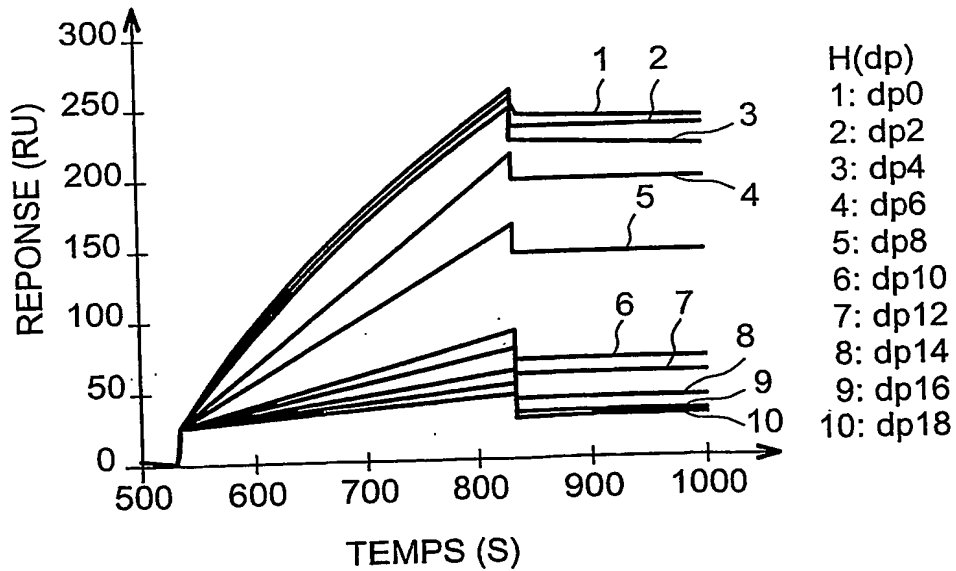


FIG. 10

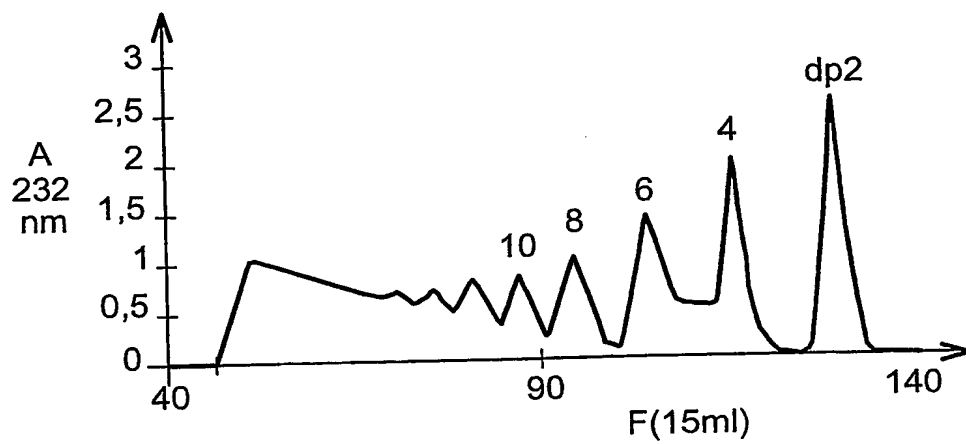


FIG. 11

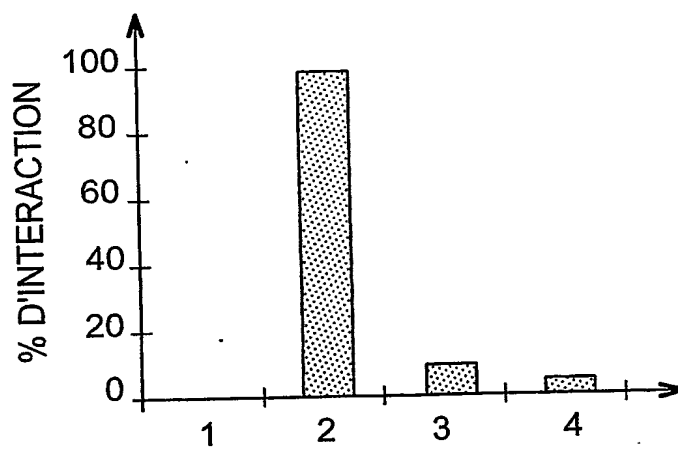


FIG. 12

## LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
CNRS

<120> COMPOSITION ANTI-VIH, PROCEDE DE FABRICATION ET  
MEDICAMENT

<130> B13987.3 EE

<140> FR n° 02 04926

<141> 2002-04-19

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Séquence Gln33 à Pro48 du CD4 humain

<400> 1

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro  
1 5 10 15

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> scorpion

<400> 2

Ala Phe Cys Asn Leu Arg Met Cys Gln Leu Ser Cys Arg Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Leu Leu Gly Lys Cys Ile Gly Asp Lys Cys Glu Cys Val Lys His  
20 25 30

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<400> 3

Cys Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Gly Pro  
20 25

<210> 4



<211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 issue de la scyllatoxine

<220>  
 <223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 4  
 Xaa Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
           1                  5                  10                  15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Gly Pro  
                   20                  25

<210> 5  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 issue de la scyllatoxine

<220>  
 <223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (23)  
 <223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 5  
 Xaa Asn Leu His Phe Cys Val Gln Arg Cys His Ser Leu Gly Leu Leu  
           1                  5                  10                  15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val  
                   20                  25

<210> 6  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 issue de la scyllatoxine

<220>  
 <223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 6  
 Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
           1                  5                  10                  15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Val

20

25

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Xaa = Cys ou acide thiopropionique

&lt;400&gt; 7

Xaa	Asn	Leu	Ala	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gly	Lys	Cys	Ala	Ser	Ser	Phe	Cys	Ala	Cys	Val
			20					25		

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Xaa = Cys ou acide thiopropionique

&lt;400&gt; 8

Xaa	Asn	Leu	Ala	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	His	Phe	Cys	Ala	Cys	Val
			20					25		

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Xaa = Cys ou acide thiopropionique

&lt;400&gt; 9

Xaa	Asn	Leu	Ala	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Asn	Phe	Cys	Ala	Cys	Val
			20					25		

<210> 10  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 issue de la scyllatoxine

<220>  
 <223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (23)  
 <223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 10  
 Xaa Asn Leu Gln Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
     1                    5                    10                    15  
 Gly Lys Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val  
                     20                    25

<210> 11  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 issue de la scyllatoxine

<220>  
 <223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (23)  
 <223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 11  
 Xaa Asn Leu His Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
     1                    5                    10                    15  
 Gly Lys Cys Gln Gly Ser Xaa Cys Thr Cys Val  
                     20                    25

<210> 12  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 issue de la scyllatoxine

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Xaa = Cys ou acide thiopropionique

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (23)

&lt;223&gt; bi-phénylalanine ou naphtylalanine

&lt;400&gt; 12

Xaa	Asn	Leu	Ala	Arg	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Xaa	Cys	Ala	Cys	Val
			20				25			

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Xaa = Cys ou acide thiopropionique

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (23)

&lt;223&gt; bi-phénylalanine ou naphtylalanine

&lt;400&gt; 13

Xaa	Asn	Leu	His	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Xaa	Cys	Ala	Cys	Val
			20				25			

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Xaa = Cys ou acide thiopropionique

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (23)

&lt;223&gt; bi-phénylalanine ou naphtylalanine

&lt;400&gt; 14

Xaa	Asn	Leu	His	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gly Lys Cys Ala Xaa Ser Xaa Cys Ala Cys Ile  
           20                                  25

<210> 15  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
           issue de la scyllatoxine

<220>  
 <223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 15  
 Xaa Asn Leu His Phe Cys Val Gln Arg Cys His Ser Leu Gly Lys Leu  
       1                  5                  10                  15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Val  
           20                                  25

<210> 16  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
           issue de la scyllatoxine

<220>  
 <223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 16  
 Xaa Asn Leu His Phe Cys Val Gln Arg Cys His Ser Leu Gly Leu Lys  
       1                  5                  10                  15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Val  
           20                                  25

<210> 17  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: séquence  
           issue de la scyllatoxine

<400> 17  
 Cys Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Ser Cys Lys Ser Leu Gly Leu Lys  
       1                  5                  10                  15

Gly Gly Cys Gln Gly Ser Phe Cys Thr Cys Gly  
           20                                  25

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la charybdotoxine

&lt;400&gt; 18

Val	Ser	Cys	Thr	Thr	Ser	Lys	Glu	Cys	Trp	Ser	Val	Cys	Gln	Arg	Leu
1				5					10					15	

His	Asn	Thr	Ser	Lys	Gly	Gly	Cys	Gln	Gly	Ser	Phe	Cys	Thr	Cys	Gly
				20				25					30		

Pro

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/01234

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/17 A61K39/42 A61K31/737 A61K31/727 A61P31/18  
 //(A61K39/42,31:737,31:727),(A61K38/17,31:737,31:727)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 04909 A (ML LAB PLC) 2 April 1992 (1992-04-02) page 5	1-15
A	WITVROUW M ET AL: "SULFATED POLYSACCHARIDES EXTRACTED FROM SEA ALGAE AS POTENTIAL ANTIVIRAL DRUGS" GENERAL PHARMACOLOGY, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 29, no. 4, 1997, pages 497-511, XP002056013 ISSN: 0306-3623 page 500	1-15
A	EP 0 332 952 A (BASF AG) 20 September 1989 (1989-09-20) page 2; figure 3	1-15

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 2003

Date of mailing of the international search report

03/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wagner, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01234

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 249 390 A (PERT CANDACE B ; RUFF MICHAEL R (US); FARRAR WILLIAM L (US)) 16 December 1987 (1987-12-16) page 3 ---	1-15
A	MOULARD MAXIME ET AL: "Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 4, February 2000 (2000-02), pages 1948-1960, XP002226781 ISSN: 0022-538X the whole document ---	1-15
E	WO 02 059146 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ; MARTIN LOIC (FR); VEAS FRANCISCO (F) 1 August 2002 (2002-08-01) claim 1 ---	7
A	SULLIVAN NANCY ET AL: "Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 6332-6338, XP002226782 ISSN: 0022-538X cited in the application page 6333 ---	1-15
A	HARROP HILARY A ET AL: "Heparin specifically inhibits binding of V3 loop antibodies to HIV-1 gp120, an effect potentiated by CD4 binding." AIDS (PHILADELPHIA), vol. 8, no. 2, 1994, pages 183-192, XP002226783 ISSN: 0269-9370 abstract -----	1-15



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/01234

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: **1-6 and 8-19 all partially**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**See supplementary sheet PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## BOX I.2

Claims No.: 1-6 and 8-19, all in part

The current claims 1-6 and 8-19 relate to an inordinately large number of derivatives of CD4 peptides. In fact they encompass so many possible variables and restrictions that they appear unclear (PCT Article 6) to such an extent that it was impossible to conduct a meaningful search of the totality of the subject matter of the claims. The search was therefore directed to the parts of the application that appear to be clear and concise, namely the derivatives defined by the sequences of SEQ ID No. 1 to 18.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR/01234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9204909	A	02-04-1992	
		AU 653962 B2	20-10-1994
		AU 8612791 A	15-04-1992
		CA 2092093 A1	26-03-1992
		EP 0550529 A1	14-07-1993
		WO 9204909 A1	02-04-1992
		IE 913341 A1	25-02-1992
		JP 6502846 T	31-03-1994
		NZ 239909 A	25-02-1993
		PT 99058 A ,B	31-08-1992
		ZA 9107596 A	27-05-1992
EP 0332952	A	20-09-1989	
		DE 3808353 A1	21-09-1989
		AU 3122189 A	14-09-1989
		EP 0332952 A2	20-09-1989
		JP 1275532 A	06-11-1989
EP 0249390	A	16-12-1987	
		AP 96 A	12-08-1990
		AT 96450 T	15-11-1993
		AU 604719 B2	03-01-1991
		AU 7540887 A	11-01-1988
		AU 7544987 A	11-01-1988
		DE 3787927 D1	02-12-1993
		DE 3787927 T2	03-03-1994
		DK 52188 A	30-03-1988
		DK 53288 A	02-02-1988
		EP 0249390 A2	16-12-1987
		EP 0249394 A2	16-12-1987
		ES 2061497 T3	16-12-1994
		FI 880470 A	02-02-1988
		FI 885630 A ,B,	02-12-1988
		FI 943795 A ,B,	18-08-1994
		HU 48907 A2	28-07-1989
		IE 61725 B1	30-11-1994
		IL 82719 A	15-11-1992
		JP 1502659 T	14-09-1989
		JP 2680011 B2	19-11-1997
		KR 9308448 B1	04-09-1993
		MX 172337 B	14-12-1993
		NO 880446 A	02-02-1988
		NO 880479 A ,B,	03-02-1988
		NZ 220485 A	29-08-1989
		PT 84992 A ,B	01-07-1987
		WO 8707613 A1	17-12-1987
		WO 8707614 A1	17-12-1987
		US 5834429 A	10-11-1998
		US 5529983 A	25-06-1996
		US 5863718 A	26-01-1999
		US 5276016 A	04-01-1994
		US 6242564 B1	05-06-2001
		ZA 8703873 A	27-07-1988
WO 02059146	A	01-08-2002	
		FR 2819809 A1	26-07-2002
		CA 2435097 A1	01-08-2002
		WO 02059146 A2	01-08-2002

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01234

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K38/17 A61K39/42 A61K31/737 A61K31/727 A61P31/18  
 //(A61K39/42, 31:737, 31:727), (A61K38/17, 31:737, 31:727)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 92 04909 A (ML LAB PLC) 2 avril 1992 (1992-04-02) page 5	1-15
A	--- WITVROUW M ET AL: "SULFATED POLYSACCHARIDES EXTRACTED FROM SEA ALGAE AS POTENTIAL ANTIVIRAL DRUGS" GENERAL PHARMACOLOGY, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 29, no. 4, 1997, pages 497-511, XP002056013 ISSN: 0306-3623 page 500	1-15
A	--- EP 0 332 952 A (BASF AG) 20 septembre 1989 (1989-09-20) page 2; figure 3 --- -/-	1-15

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 novembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/12/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Wagner, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No

PCT/FR/01234

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME RELEVANTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 249 390 A (PERT CANDACE B ; RUFF MICHAEL R (US); FARRAR WILLIAM L (US)) 16 décembre 1987 (1987-12-16) page 3 -----	1-15
A	MOULARD MAXIME ET AL: "Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 4, février 2000 (2000-02), pages 1948-1960, XP002226781 ISSN: 0022-538X le document en entier -----	1-15
E	WO 02 059146 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ; MARTIN LOIC (FR); VEAS FRANCISCO (F) 1 août 2002 (2002-08-01) revendication 1 -----	7
A	SULLIVAN NANCY ET AL: "Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 8, août 1998 (1998-08), pages 6332-6338, XP002226782 ISSN: 0022-538X cité dans la demande page 6333 -----	1-15
A	HARROP HILARY A ET AL: "Heparin specifically inhibits binding of V3 loop antibodies to HIV-1 gp120, an effect potentiated by CD4 binding." AIDS (PHILADELPHIA), vol. 8, no. 2, 1994, pages 183-192, XP002226783 ISSN: 0269-9370 abrégé -----	1-15

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR 03/01234

## Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> 1-6 et 8-19 tous partiellement se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1-6 et 8-19 tous partiellement

Les revendications 1-6, 8-19 présentes ont trait à une très grande variété dérivés de peptides CD4. En fait, les revendications contiennent tant de variables possibles et de conditions que le manque de clarté au sens de l'Article 6 PCT qui s'en suit, est d'une importance telle qu'une recherche significative de tout l'objet des revendications devient impossible. Par conséquent, la recherche a été effectuée pour les parties de la demande qui apparaissent être claires et concises), c'est à dire les dérivés définis par les séquences Seq. Id. No. 1 à 18.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01234

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9204909	A	02-04-1992	AU 653962 B2	20-10-1994
			AU 8612791 A	15-04-1992
			CA 2092093 A1	26-03-1992
			EP 0550529 A1	14-07-1993
			WO 9204909 A1	02-04-1992
			IE 913341 A1	25-02-1992
			JP 6502846 T	31-03-1994
			NZ 239909 A	25-02-1993
			PT 99058 A ,B	31-08-1992
			ZA 9107596 A	27-05-1992
EP 0332952	A	20-09-1989	DE 3808353 A1	21-09-1989
			AU 3122189 A	14-09-1989
			EP 0332952 A2	20-09-1989
			JP 1275532 A	06-11-1989
EP 0249390	A	16-12-1987	AP 96 A	12-08-1990
			AT 96450 T	15-11-1993
			AU 604719 B2	03-01-1991
			AU 7540887 A	11-01-1988
			AU 7544987 A	11-01-1988
			DE 3787927 D1	02-12-1993
			DE 3787927 T2	03-03-1994
			DK 52188 A	30-03-1988
			DK 53288 A	02-02-1988
			EP 0249390 A2	16-12-1987
			EP 0249394 A2	16-12-1987
			ES 2061497 T3	16-12-1994
			FI 880470 A	02-02-1988
			FI 885630 A ,B,	02-12-1988
			FI 943795 A ,B,	18-08-1994
			HU 48907 A2	28-07-1989
			IE 61725 B1	30-11-1994
			IL 82719 A	15-11-1992
			JP 1502659 T	14-09-1989
			JP 2680011 B2	19-11-1997
			KR 9308448 B1	04-09-1993
			MX 172337 B	14-12-1993
			NO 880446 A	02-02-1988
			NO 880479 A ,B,	03-02-1988
			NZ 220485 A	29-08-1989
			PT 84992 A ,B	01-07-1987
			WO 8707613 A1	17-12-1987
			WO 8707614 A1	17-12-1987
			US 5834429 A	10-11-1998
			US 5529983 A	25-06-1996
			US 5863718 A	26-01-1999
			US 5276016 A	04-01-1994
			US 6242564 B1	05-06-2001
			ZA 8703873 A	27-07-1988
WO 02059146	A	01-08-2002	FR 2819809 A1	26-07-2002
			CA 2435097 A1	01-08-2002
			WO 02059146 A2	01-08-2002